

भारतीय वैज्ञानिक एवं औद्योगिक अनुसंधान पत्रिका
वर्ष 27 अंक (1&2) जून एवं दिसम्बर 2019 पृ. 52-56

कायमेरिक जीन निर्माण के लिए ब्रिज-ओवरलैप-एक्सटेंशन पीसीआर विधि

राज कुमार मेहता एवं जगमोहन सिंह

सीएसआईआर-माइक्रोबियल प्रौद्योगिकी संस्थान, चंडीगढ़ 160036

सारांश : इस शोधपत्र में ब्रिज-ओवरलैप-एक्सटेंशन पीसीआर दृष्टिकोण प्रस्तुत किया जा रहा है जिसमें कई अनुप्रयोग हो सकते हैं, जैसे कि एपिटॉप टैग, परमाणु स्थानीयकरण सिग्नल, सिक्रेटरी (स्राव का) या प्रोटीलाइटिक संकेत या अन्य कार्यात्मक तत्वों को एच्छिक प्रोटीन में सम्मिलित करना। इसके द्वारा छोटे या बड़े आकार के अनुक्रम तत्वों को, जिसका ओलिगोन्यूक्लियोटाइड सिंथेसिस हो सकता है, को सम्मिलित किया जा सकता है। इस विधि की एक विशिष्ट विशेषता यह है कि बिना वाइल्ड टाइप टेम्पलेट के, ओलिगोन्यूक्लियोटाइड ओवरलैपिंग का उपयोग करके हम एक लंबे प्राइमर का संश्लेषण कर सकते हैं जिसमें दूसरे जीन का ओवरलैपिंग भाग भी शामिल होगा। टेम्पलेट डीएनए का उपयोग ना करने से इसके द्वारा पुनः ओलिगोन्यूक्लियोटाइड की वाइल्ड टाइप टेम्पलेट से एनीलिंग की समस्या से बचने में मदद मिलती है। इस तकनीक से 100% सही क्लोन प्राप्त करने की सफलता, इस तकनीक की दक्षता को दर्शाती है। इस तकनीक से बनाया गया स्ट्रेप्टोकाइनेज़ का कायमेरिक जीन (पी-फैक्टर और एसके (स्ट्रेप्टोकाइनेज़) का संलयन), जब एक अभिव्यक्ति वेक्टर (एक्सप्रेशन वेक्टर) में क्लोन किया गया और शाइजोसेकरोमाइसिस पॉम्बे के एक उपयुक्त स्ट्रेन में इस जीन का एक्सप्रेशन ज्यादा पाया गया। इसलिए, यह तकनीक कायमेरिक जीन के निर्माण के लिए एक वैकल्पिक विधि के रूप में कार्य कर सकती है।

Bridge-overlap-Extension PCR method for constructing chimeric genes

Raj Kumar Mehta & Jagmohan Singh

CSIR-Institute of Microbial Technology, Chandigarh 160036

Abstract

We understand that this bridge-overlap-extension PCR approach can have several applications, such as insertion of epitope tags, nuclear localization signals, secretory or proteolytic signals, insertion of DNA-binding regions or other functional elements into proteins of interest. The sequence element to be inserted can be of small size or long both being within the limits of efficient oligonucleotide synthesis. A distinct feature of this method is that by using overlapping oligonucleotides and bringing about a bridging step, we carry out the synthesis of a longer primer that contains an overlap with the hybrid PCR product, in the absence of any wild-type template. This helps in avoiding the use of template DNA and, therefore, the problem of re-annealing by oligonucleotides to wild-type template during the PCR steps altogether. The success of the technique is indicated by the 100% efficiency of obtaining the correct clones. Moreover, a high level of expression of precursor (fusion of P-factor and SK) and mature SK was observed when the hybrid gene construct, was cloned into an expression vector and transformed in suitable strains of *S-pombe*. Therefore, this new approach could serve as an alternative method for construction of chimeric genes.

प्रस्तावना

चूँकि पीसीआर (बहुलक शृंखला प्रतिक्रिया)¹ की खोज अनगिनत नवाचारों ने आधुनिक आण्विक जीवविज्ञान में कई महत्वपूर्ण प्रगति की है। पूर्वनिर्धारित परिवर्तनों को लक्ष्य जीन (वांछित जीन) में साइट-विशिष्ट उत्परिवर्तन और संकर से जीन का निर्माण करना, इस प्रतिक्रिया का ऐसा एक उदाहरण है। विकास के उत्तरार्द्ध में, कायमेरिक जीन संरचनाएं ओवरलैप-एक्सटेंशन

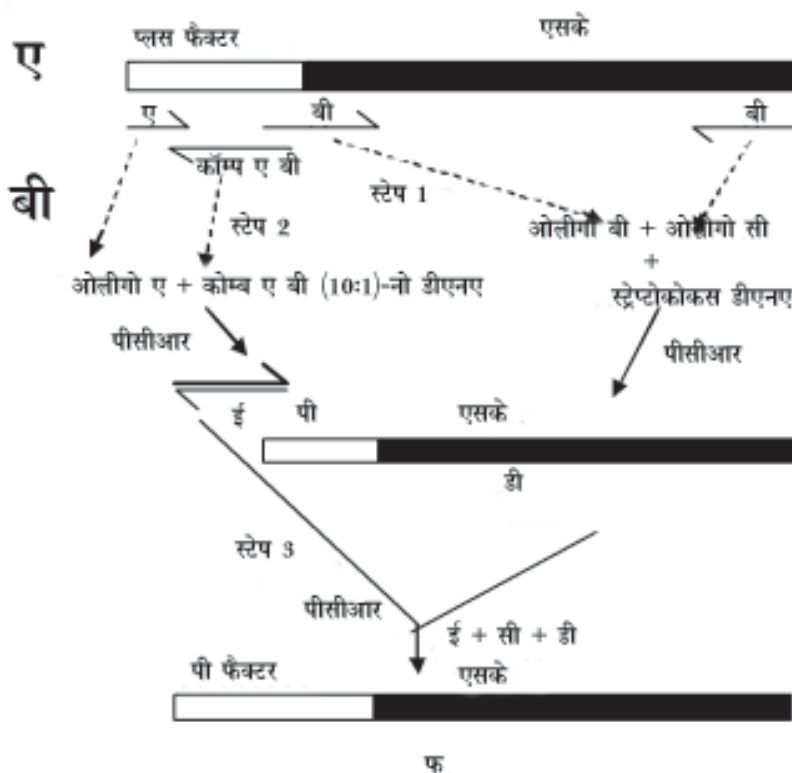
द्वारा संश्लेषित की जाने लगी, इस तकनीक को ओवरलैप द्वारा 'स्प्लाइसिंग' (एसओपी) कहा जाता है¹। इस तकनीक में, पीसीआर उत्पादों के अनुरूप है जो विभाजित होने वाली जीन पूरक प्राइमरों का उपयोग करके संश्लेषित की जाती है जिसमें जंक्शन का प्रतिनिधित्व करने वाले अनुक्रम होते हैं वे दो जीन, जो आधे प्रतिक्रियाओं से संश्लेषित दो पीसीआर उत्पादों की एनीलिंग की अनुमति देते हैं। एनीलिंग के बाद, दो बाहरी प्राइमरों का उपयोग

करके एक कायमेरिक पीसीआर उत्पाद प्राप्त किया जाता है। मेगाप्राइमर दृष्टिकोण तीन ओलिगोन्यूक्लियोटाइड का उपयोग करता है। पहले चरण में, उत्परिवर्ती प्राइमर का उपयोग एक मेगाप्राइमर उत्पाद को संश्लेषित करने के लिए एक रिवर्स प्राइमर के साथ किया जाता है, जो दूसरे पीसीआर चरण में फॉरवर्ड प्राइमर के साथ एक प्राइमर के रूप में कार्य करके उत्परिवर्तन युक्त पूर्ण जीन को संश्लेषित करता है⁹।

हालांकि, हमारी प्रयोगशाला में, विशेष रूप से एसओई तकनीक का प्रयोग करके साइट-निर्देशित उत्परिवर्तन जीन का निर्माण की संभावना केवल 10% से भी कम होती है। इसका कारण बिल्कुल स्पष्ट नहीं है, लेकिन यह ओलिगोन्यूक्लियोटाइड के पुनर्मिलन का परिणाम हो सकता है जो वाइल्ड टाइप के टेम्प्लेट में उत्परिवर्ती ओलिगोन्यूक्लियोटाइड द्वारा उत्पादित टेम्प्लेट्स बना देते हैं (जिनको स्पष्ट रूप से आधी प्रतिक्रियाओं के उत्पादों को अलगाव के बावजूद पूरी तरह से अगरोज़ जेल से हटाया नहीं जाता है)। इस प्रकार उत्परिवर्तित डबल स्ट्रैंडिड डीएनए के अणुओं के प्रवर्धन को कम करता है। कायमेरिक जीन का निर्माण करते समय भी इसी तरह की समस्याएं आती हैं। यहां, हमने इस समस्या को एक संशोधन द्वारा मोड़ने की मांग की है जो एक सटीक निर्माण के लिए अनुमति देता है, दो या दो से अधिक जीन के हिस्सों के बीच कायमेरिक बनाने की। हालांकि इस विधि को ऐसे मामलों तक सीमित कर सकता है जिनमें जीन सेगमेंट में से एक छोटे आकार का हो, यह दो ब्रिजिंग ओवरलैप पीसीआर का उपयोग करके हासिल किया जाता है।

शीजोसैक्रोमाइसिस पॉम्बे का सिक्रेटरी सिग्नल और स्ट्रेप्टोकोकस स्पीशीज के स्ट्रेप्टोकाइनेस के कायमेरिक जीन का निर्माण : यहां, हमने इस समस्या को एक संशोधन द्वारा सुलझाने की कोशिश की है जो एक सटीक निर्माण के लिए अनुमति देता है दो जीन या दो जीन के हिस्सों के बीच कायमेरिक जीन के निर्माण के लिए, हालांकि यह अपने आवेदन को ऐसे मामलों तक सीमित कर सकता है जिनमें से एक जीन सेगमेंट का आकार छोटा हो। यह दो ब्रिजिंग ओवरलैप पीसीआर का उपयोग कर हासिल किया जाता है, जैसा कि चित्र-1 में उल्लिखित है। यहां पर वर्णित प्रयोग में इस तकनीक से पी-फैक्टर (2) का सिक्रेटरी सिग्नल और स्ट्रेप्टोकोकस स्पीशीज का स्ट्रेप्टोकाइनेस (3) का कायमेरिक जीन (पी-कारक और एसके (स्ट्रेप्टोकाइनेस) का संलयन) बनाया गया है। प्रयोगात्मक डिजाइन में, पहला पीसीआर पी-फैक्टर (2) के 3 छोर और स्ट्रेप्टोकाइनेस (एसके) जीन के संसाधित रूप के 5 छोर के अनुक्रम के बीच जंक्शन के अनुरूप आगे ओलिगोन्यूक्लियोटाइड बी (चित्र-1) और जिसके साथ एक रिवर्स ओलिगोन्यूक्लियोटाइड

सी (चित्र-1) जो स्ट्रेप्टोकाइनेस (3) के सी-टर्मिनल का प्रतिनिधित्व करता है, का उपयोग करके किया जाता है। दूसरा पीसीआर ब्रिजिंग ओलिगोन्यूक्लियोटाइड कॉम्प एबी (चित्र-1, ए और बी) और आगे ओलिगोन्यूक्लियोटाइड ए (चित्र-1, ए और बी), जो पी-फैक्टर के सिग्नल के एन-टर्मिनल क्षेत्र (चित्र-1) से मेल खाता है, का उपयोग करके किया जाता है। ब्रिजिंग ओलिगोन्यूक्लियोटाइड कॉम्प ए बी में निकटवर्ती फॉरवर्ड प्राइमर ओलिगोन्यूक्लियोटाइड ए में दोनों 3 प्राइम अंत में, और 3 प्राइम अंत तक है, और ओलिगोन्यूक्लियोटाइड बी के दूरस्थ भावना प्राइमर में भी इसके 5 प्राइमअंत से 5 प्राइम अंत तक आंशिक पूरकता है। ओलिगोन्यूक्लियोटाइड का मध्य क्षेत्र, निकटवर्ती और दूरस्थ खंडों के बीच का अंतर को ओलिगोन्यूक्लियोटाइड ए और बी, कवर नहीं करते हैं। दूसरा पीसीआर में ओलिगोन्यूक्लियोटाइड ए के 10:1 मोलर एक्सस का उपयोग करके किया जाता है ताकि महत्वपूर्ण मात्रा में हाइब्रिड उत्पाद ई (चित्र-1 बी) का उत्पादन हो सके। इस उत्पाद में अब पी-फैक्टर (चित्र-1 ए) का पूर्ण क्षेत्र शामिल है जो ओलिगोन्यूक्लियोटाइड ए में मौजूद नहीं है, पी-कारक के पूर्ण अनुक्रम की लंबाई के कारण और इसमें एक ओर क्षेत्र भी शामिल है जो ओलिगोन्यूक्लियोटाइड जोड़ी बी और सी द्वारा उत्पन्न पीसीआर उत्पाद के 5 प्राइम एंड के साथ पूरकता है। फिर, असममित रूप से बढ़ाया पीसीआर उत्पाद ई है अंतिम पीसीआर चरण में पहले चरण से ओलिगोन्यूक्लियोटाइड सी और ओलिगोन्यूक्लियोटाइड मुक्त पीसीआर उत्पाद डी के साथ संयोजन में प्रयोग किया जाता है ताकि कायमेरिक उत्पाद एफ (चित्र-1 बी, चरण 3) उत्पन्न हो सके। चित्र-1 में इन सभी चरणों को रेखांकित करता है। जिसके परिणामस्वरूप तीन चरणों से पीसीआर उत्पादों को एग्रोज जेल इलेक्ट्रोफोरेसिस द्वारा देखा जाता है। चरण 1 ने 1.32 केबी बैंड को पी-कारक के दूरस्थ हिस्से के जंक्शन और पूर्ण अनुक्रम एसके जीन का प्रतिनिधित्व किया (चित्र-2 ए, लेन 2 और चित्र-1 बी, उत्पाद डी)। चरण 2 (चित्र-1 से असममित पीसीआर का उत्पाद 1 बी, उत्पाद ई) अलग-अलग दिखाया गया है (चित्र-2 बी, लेन 3) ओलिगोन्यूक्लियोटाइड के नियंत्रण मिश्रण के साथ प्रतिक्रिया के लिए (चित्र-2 बी, लेन 2), क्योंकि इन्हें उचित समाधान के लिए 2.5% अगरोज़ जेल पर चलाना था। हम देखते हैं कि यह कदम एक स्मूरी लगभग 90 बेसिज़ का बैंड (चित्र-2 बी, लेन 3) पैदा करता है जो 65 बेसिज़बैंड (चित्र-2 बी, लेन 2) के शुरुआती ओलिगोन्यूक्लियोटाइड्स की तुलना में धीमी गतिशीलता के साथ चलता है। चरण 3 में 1.39 केबी (चित्र-2 ए, लेन 3) की अनुमानित लंबाई का उत्पाद उत्पन्न करता है। उत्पाद को एक उपयुक्त अभिव्यक्ति वेक्टर



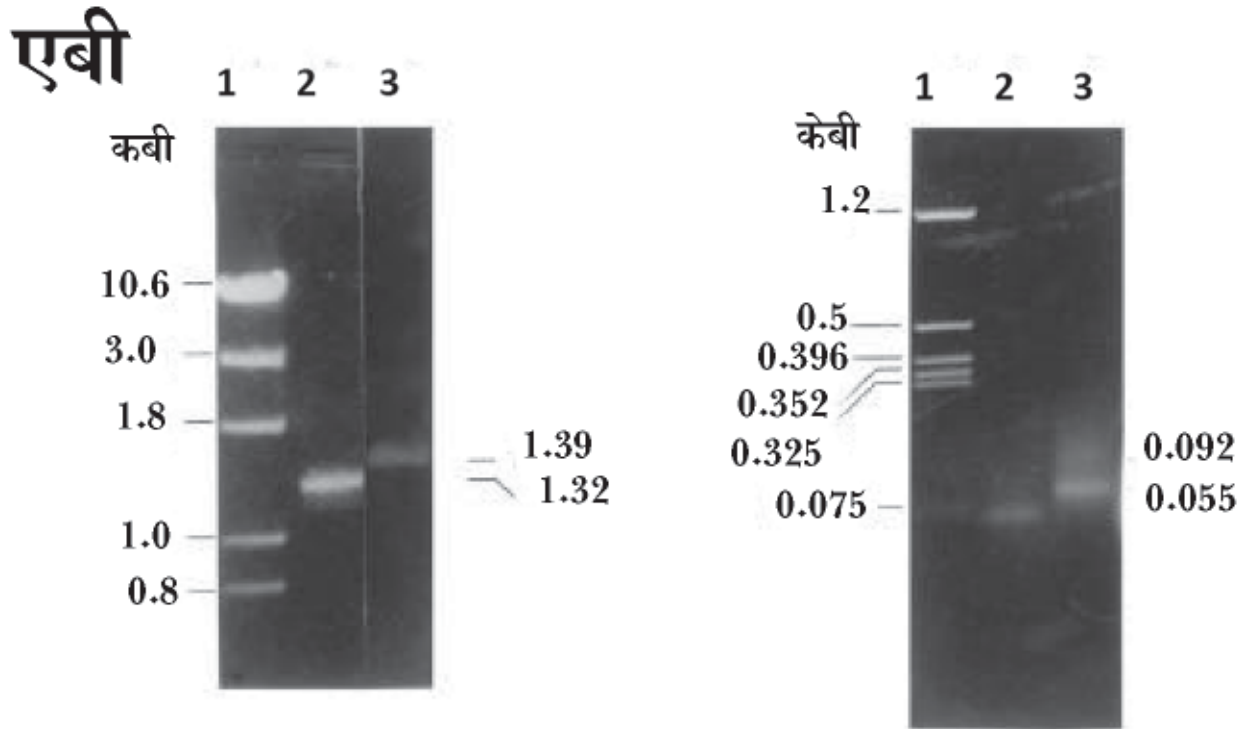
चित्र 1 – प्रयोगात्मक डिज़ाइन का एक योजनाबद्ध प्रतिनिधित्व और ब्रिज-ओवरलैप-एक्सटेंशन पीसीआर दृष्टिकोण में एस. पॉम्बे के पी फैक्टर का सिंक्रेटरी सिग्नल और एसके से निर्मित कायमेरिक जीन के संश्लेषण में शामिल कदम।

(एक्सप्रेसन वेक्टर) में क्लोन किया गया था। पांच स्वतंत्र क्लोनों के अनुक्रम से संकेत मिलता है कि सभी को सही अनुक्रम (डेटा दिखाया नहीं गया) में पाया, ये इस तकनीक की 100% दक्षता को दर्शाता है। इसके अलावा, अभिव्यक्ति वेक्टर (एक्सप्रेसन वेक्टर) में कायमेरिक निर्माण वाले सभी पुनः संयोजक क्लोनों ने स्कीम दूध प्लेट्स (3) पर हेलो परख विधि द्वारा एसके को कुशलता से व्यक्त किया है।

प्रयोगात्मक परीक्षण : पीसीआर के लिए विस्तृत स्थितियों का वर्णन नीचे दिया गया है। चरण 1 के लिए, टीई बफर (10 एमएम टरीस-एचसीएल, पीएच 8.0, 1 एमएम ईडीटीए) में स्ट्रेप्टोकोकस कोशिकाओं को उबलने के बाद प्राप्त डीएनए (50 नैनो ग्राम), ओलिगोन्यूक्लियोटाइड बी और सी और 2.5 यू तक डीएनए पॉलीमरेज़ का उपयोग करके (पीई बायोसिस्टम, फोस्टर सिटी, सीए, यूएसए) 50 माइक्रोलीटर की अंतिम मात्रा के संयोजन में किया जाता था। यह सब निर्माता (पीई बायोसिस्टम) द्वारा बफर की शर्तों की सिफारिश के अनुसार किया गया। साइकिलिंग की स्थिति थी: 94 डिग्री सेल्सियस पर 3 मिनट के लिए डीनेचुरेशन,

इसके बाद 30 चक्र के 1 मिनट के लिए 94 डिग्री सेल्सियस पर डीनेचुरेशन, 30 सेकंड के लिए 58 डिग्री सेल्सियस पर एनीलिंग और 72 डिग्री सेल्सियस पर 2 मिनट के लिए विस्तार और अंतिम विस्तार चरण 5 मिनट के लिए 72 डिग्री सेल्सियस का होता है। उत्पाद डी को अगरोज जैल इलेक्ट्रोफोरेसिस द्वारा हल किया गया था और जीन क्लीन प्रक्रिया (बीआईओ 101, विस्टा, सीए, यूएसए) द्वारा ओलिगोन्यूक्लियोटाइड को दूर कर शुद्ध किया गया।

चरण 2 में, 100 नैनोग्राम ओलिगोन्यूक्लियोटाइड ए और 10 नैनोग्राम ओलिगोन्यूक्लियोटाइड बी का उपयोग समान साइकिलिंग के साथ किया जाता है, सिवाय इसके कि 20 चक्रों में डीनेचुरेशन, एनीलिंग और विस्तार के लिये 30 सेकंड और एनीलिंग तापमान 55 डिग्री सेल्सियस उत्पाद ई उत्पादन के लिए दिया गया। तीसरे चरण में, 50 नैनोग्राम ओलिगोन्यूक्लियोटाइड-मुक्त उत्पाद डी जो चरण 1 में उत्पादित हुआ और 100 नैनोग्राम उत्पाद ई और 50 नैनोग्राम रिवर्स ओलिगोन्यूक्लियोटाइड सी का इस्तेमाल किया गया था। यह आवश्यक नहीं था कि उत्पाद ई को शुद्ध करें। साइकिलिंग की स्थिति चरण 1 के समान थी, सिवाय इसके कि



चित्र 2 — पी-फैक्टर/एसके कायमेरिक का प्रतिनिधित्व करने वाले पीसीआर उत्पादों के एगोज जैल इलेक्ट्रोफोरेसिस

72 डिग्री सेल्सियस पर विस्तार 1 मिनट के लिए था, और 0.01 यूनिट वेंट पॉलीमरेज़ (न्यू इंग्लैंड बायोलैब, बेवर्ली, एमए, यूएसए) का प्रयोग ब्लंट-एंडेड कायमेरिक जीन का उत्पादन करने के लिए शामिल किया गया विभिन्न ओलिगोन्यूक्लियोटाइड के लिए एनीलिंग चरणों के तापमान को जीन रनर प्रोग्राम संस्करण 3.02 (हेस्टिंग्स सॉफ्टवेयर, हेस्टिंग्स-ऑन-हडसन, एनवाई, यूएसए) का उपयोग करके निर्धारित किया गया था।

परिणाम एवं विवेचना

हम समझते हैं कि इस ब्रिज-ओवरलैप-एक्सटेंशन पीसीआर दृष्टिकोण में कई अनुप्रयोग हो सकते हैं, जैसे- सम्मिलन एपिटॉप टैग, परमाणु स्थानीयकरण सिग्नल, सिक्रेटरी या प्रोटीलाइटिक सिग्नल, डीएनए बाध्यकारी क्षेत्रों (बान्डिंग रीजन) या अन्य कार्यात्मक तत्व का ऐच्छिक प्रोटीन में सम्मिलन। अनुक्रमित तत्व का छोटा आकार (30 बीपी) या 150 बीपी तक, दोनों कुशल ओलिगोन्यूक्लियोटाइड संश्लेषण की सीमा के भीतर हो सकते हैं। इस विधि की विशिष्ट विशेषता यह है कि ओलिगोन्यूक्लियोटाइड ओवरलैपिंग और एक ब्रिजिंग चरण (चित्र 1, चरण 2) लाने के द्वारा, हम लंबे प्राइमर के संश्लेषण को पूरा करते हैं जिसमें किसी प्रकार के टेम्पलेट की अनुपस्थिति में चरण 1 के हाइब्रिड पीसीआर

उत्पाद के साथ ओवरलैप होता है जिससे वाइल्ड टाइप टेम्पलेट डीएनए की जरूरत नहीं होती, इसलिये अगले पीसीआर चरणों के दौरान ओलिगोन्यूक्लियोटाइड द्वारा वाइल्ड टाइप के टेम्पलेट के साथ एनीलिंग की समस्या से बचाता है। तर्क पहले वर्णित मेगाप्रिमर-मध्यस्थ, साइट-निर्देशित म्यूटाजेनेसिस विधि के समान है (5)। हालांकि, मेगाप्राइमर दृष्टिकोण के विपरीत, जो तीन ओलिगोन्यूक्लियोटाइड का उपयोग करता है, हमारी विधि चार ओलिगोन्यूक्लियोटाइड का उपयोग करती है। वर्तमान विधि की एक और स्पष्ट कमी निकटवर्ती जीन सेगमेंट की लंबाई सीमित होती है, जो ओलिगोन्यूक्लियोटाइड सिंथेसाइज़र की लंबाई की सीमाओं से निर्धारित होती है। हालांकि, कुछ कंपनियां आजकल ओलिगोन्यूक्लियोटाइड्स को संश्लेषित करने के लिए सुविधाएं प्रदान करती हैं जो लगभग 140 बेसिज या उससे अधिक हैं, जो छोटे जीन सेगमेंट की सीमा को लगभग 250 बेसिज और उससे आगे तक बढ़ा सकती हैं। फिर भी, यह अनूठी विशेषता हमारी पद्धति को विशेष रूप से उपयुक्त बना सकती है जहां छोटे सिग्नल जैसे- सिक्रेटरी सिग्नल, परमाणु स्थानीयकरण संकेत, फॉस्फोरिलेशन साइट्स, एपिटॉप टैग, डीएनए-बाध्यकारी क्षेत्रों (डीएनए बान्डिंग रीजन) या इन्टर प्रोटीन इंटरैक्शन डोमेन शामिल किए जाने की जरूरत होती है। इस

तकनीक से 100% सही क्लोन प्राप्त किया जा सकता है। इसके अलावा, इस तकनीक से पी-फैक्टर और एसके का संलयन करके जब इस हाइब्रिड जीन को अभिव्यक्ति वैक्टर में क्लोन किया गया और एस. पॉम्बे के उपयुक्त उपभेदों में परिवर्तित करके अग्रदूत की अभिव्यक्ति का उच्च स्तर और परिपक्व एसके प्राप्त हुआ (डेटा नहीं दिखाया गया है)।

निष्कर्ष

प्रस्तुत लेख में लेखकों द्वारा ब्रिज-ओवरलैप-एक्सटेंशन पीसीआर तकनीक से कायमेरिक जीन बनाने की सफल विधि पर शोध कार्य को प्रस्तुत किया है। पहले भी हमारी प्रयोगशाला में कई विधियों से, विशेष रूप से एसओई तकनीक का प्रयोग करके साइट-निर्देशित उत्परिवर्तन जीन (मऊटेटीड जीन) का निर्माण किया जाता है परंतु इसकी संभावना केवल 10% से भी कम होती है। परन्तु ब्रिज-ओवरलैप-एक्सटेंशन पीसीआर तकनीक से सही क्लोन प्राप्त करने की सफलता 100% होती है। इसलिए इस लेख में यह निष्कर्ष निकला गया है कि यह नया दृष्टिकोण कायमेरिक

जीन के निर्माण के लिए वैकल्पिक विधि के रूप में कार्य कर सकता है।

सन्दर्भ

1. Horton R M, Hunt H D, Pullen J K & Pease L R Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension, *Gene* **77** (1989) 61-68.
2. Imai Y & Yamamoto M, The fission yeast mating pheromone P-factor: its molecular structure, gene structure, and ability to induce gene expression and G 1 arrest in the mating partner, *Genes Dev*, **8** (1994) 328-338.
3. Malke H, Roe B & Ferretti J J Nucleotide sequence of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* H 46A *Gene*, **34** (1985) 357-362.
4. Mullis K B & Faloona F, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction, *Methods Enzymol*, **155** (1987) 335-350.
5. Sarkar G & Sommer S S The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis, *BioTechniques*, **8** (1990) 404-407.